ALOKA
Labelling ONE

初版：20101203
RN1-3763Rev.0

アルカリホスファターゼ標識キット 取扱説明書

ALR-103　　保存温度 −20℃

注意

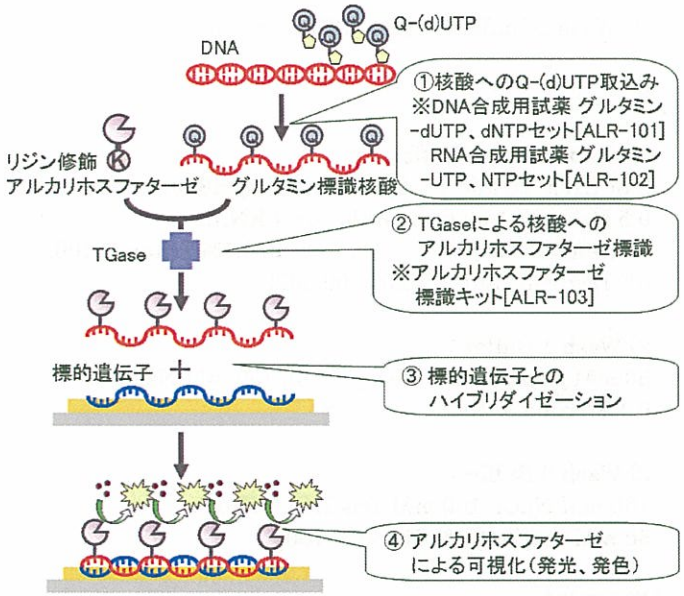
1. 本製品には毒性のある物質は含まれておりませんが、万が一、試薬が皮膚や目に付着、あるいは口内に入った場合は流水で洗い流してください。
2. 取扱説明書の使用上の注意に従ってご使用ください。

【概要】

本製品は、グルタミン残基（Q）が標識された核酸にアルカリホスファターゼを標識する試薬キットです。

本製品添付のトランスグルタミナーゼ（TGase）はリジン残基（K）とグルタミン残基を連結する酵素であり、リジン修飾アルカリホスファターゼ（製品添付）とグルタミン標識核酸を連結することができます。アルカリホスファターゼ標識後の核酸は、サザンブロットハイブリダイゼーション、ノーザンブロットハイブリダイゼーションなどの検出プローブとして使用することができます。

本製品を使用する前に、あらかじめグルタミン標識核酸を合成する必要があります。
グルタミン標識 DNA は DNA 合成用試薬 グルタミン-dUTP、dNTP セット[ALR-101] を用いて合成し、
グルタミン標識 RNA は RNA 合成用試薬 グルタミン-UTP、NTP セット[ALR-102] を用いて合成します。



【内容】

本製品は、5 本の試薬からなります。

試薬名	濃度	容量
Alkaline phosphatase	8 mg/mL	100 µL
TGase	10 U/mL	40 µL
Buffer	10 x	80 µL
DEPC treated Water		1 mL
Stop solution	10 x	80 µL

【包装】

20 反応用
（取扱説明書記載の反応を実施した場合）

【保存方法】

−20℃にて保存してください。

【使用期限】

製品到着日より 6 ヶ月
（但し、未開封かつ−20℃にて保存の場合）
開封後はなるべくお早めにご使用ください。

【使用上の注意】

① 本製品をご使用の際には、取扱説明書をご一読の上、使用してください。
② 本製品は、研究用試薬です。臨床診断用には使用しないでください。
③ 本製品には毒性のある物質は含まれておりませんが、万が一、試薬が皮膚や目に付着、あるいは口内に入った場合は流水で洗い流してください。
④ 使用期限が切れた製品を使用しないでください。使用期限が切れた製品を使用した場合には反応が正確に行えない可能性があります。
⑤ 反応液の調製は氷上で行ってください。氷上で行わない場合には反応が正確に行えない可能性があります。

【反応に必要な試薬、機器】

試薬、機器	
恒温槽	（アルカリホスファターゼ標識反応用）

【検出に必要な試薬、機器】

試薬、機器	
発色試薬	以下製品を推奨しております。 ・NBT(1383213/ Roche) ・BCIP (1383221/ Roche)
発光試薬	以下製品を推奨しております。 ・CDP-Star (1759051/ Roche)

【使用方法】
(1) アルカリホスファターゼ標識反応
① PCR チューブにグルタミン標識核酸を 400 ng 加え、95℃、5 分間加熱し、熱変性してください。
② 加熱後、氷上へ移して急冷してください。
③ 熱変性したグルタミン標識核酸に氷上で以下の各試薬を加え、良く混合してください。

試薬名	容量
グルタミン標識核酸(熱変性済)	400 ng
Buffer	4 μL
Alkaline phosphatase	5 μL
TGase	2 μL
DEPC Treated Water	to 40 μL

④ PCR チューブを恒温槽にセットし、40℃でインキュベーションしてください。
(DNA は 30 分間、RNA は 2 時間)
⑤ Stop solution を 4 μL 加え、TGase の反応を停止してください。

メモ：標識率を向上させたい場合は、Alkaline phosphatase 添加量を増やしてください。ただし、増やしすぎると、検出段階で、未反応 Alkaline phosphatase がバックグラウンドの原因になることがあります。

メモ：標識反応時間を延長すると、標識率が向上することがあります。

メモ：Stop solution が析出する場合があります。析出している場合は、使用前に 37℃で温め、析出物を融解してからご使用ください。

【アルカリホスファターゼ標識核酸の使用上の注意】
① 本製品添付のアルカリホスファターゼは SDS や formamide 存在下で活性が低下することがあります。ハイブリダイゼーション以降の工程では本取扱説明書に記載のバッファーの使用を推奨します。
② 発色系で検出する際には 50-60℃で発色反応をおこなってください。化学発光系では 50-60℃でプレインキュベーションの上、検出をおこなってください。

【アルカリホスファターゼ標識確認】
TGase によるアルカリホスファターゼ標識をアガロースゲル電気泳動で確認できます。以下は、グルタミン標識 DNA（566bp）にアルカリホスファターゼ標識したサンプルを電気泳動した例です。分子量が大きくシフトしていることから、グルタミン標識 DNA にアルカリホスファターゼが標識されたことがわかります。

M: 分子量マーカー
1: 0% Q-DNA
2: 20% Q-DNA
3: 40% Q-DNA
4: 60% Q-DNA
5: 80% Q-DNA

【使用例】
～ドットブロットハイブリダイゼーション（DNA）～
◎PCR
① DNA 合成用試薬 グルタミン-dUTP、dNTP セット [ALR-101] 取扱説明書に従って反応
↓
② PCR 産物を 30 μL にメスアップし、QIA quick PCR Purification kit（Qiagen）を用いて精製
↓
③ 専用の溶出バッファー30 μL で溶出
↓
④ アガロースゲル電気泳動による濃度確認

◎アルカリホスファターゼ標識反応
⑤ 左記に従ってアルカリホスファターゼ標識反応（40℃、30 分間）
↓
⑥ Stop solution を 4 μL 加え、TGase の反応を停止

◎ハイブリダイゼーション
⑦ Hybridization Buffer [1]でプレハイブリダイゼーション（55℃、30 分間）
↓
⑧ Hybridization Buffer [1] にプローブを加えてハイブリダイゼーション（プローブ濃度 10 ng/mL、 55℃、オーバーナイト）
↓
⑨ Wash 1 Buffer [2]で洗浄（55℃、10 分間、2 回）
↓
⑩ Wash 2 Buffer [3]で洗浄（室温、5 分間、2 回）
↓
⑪ 検出

1) Hybridization Buffer：
2 M Urea, 20 mM phosphate buffer (pH8.0),
0.5 M NaCl, 1 mg/mL torula yeast RNA,
1× Denhardt's solution, 1% Casein, 0.1% Triton X-100,
5% Dextran sulfate (MW: 500,000)

2) Wash 1 Buffer：
50 mM phosphate buffer (pH8.0), 150 mM NaCl,
0.1% Triton X-100

3) Wash 2 Buffer：
100 mM NaCl, 100 mM Tris-HCl (pH9.5),
50 mM $MgCl_2$, 0.1% Triton X-100

【廃棄方法】
本製品には、ポリスチレン（ケース）、ポリプロピレン（試薬チューブ）、紙（取扱説明書）を用いています。廃棄の際は分別し、都道府県・市町村が定める廃棄物の処理法に従って廃棄してください。

製造販売元
アロカ株式会社
〒181-8622 東京都三鷹市牟礼 6 丁目 22 番 1 号
計測システム営業部 (0422)45-5131
http://www.aloka.co.jp
e-mail: bio@aloka.co.jp